



TITLE:

酵素反応はどこまで正確か？

AUTHOR(S):

滝田, 禎亮; 保川, 清; 久好, 哲郎; 横川, 貫太; 馬場, 美
聡; 片野, 裕太; 佐久間, 宙

CITATION:

滝田, 禎亮 ...[et al]. 酵素反応はどこまで正確か？. 京都大学アカデミッ
クデイ2015: ポスター/展示 2015

ISSUE DATE:

2015-10-04

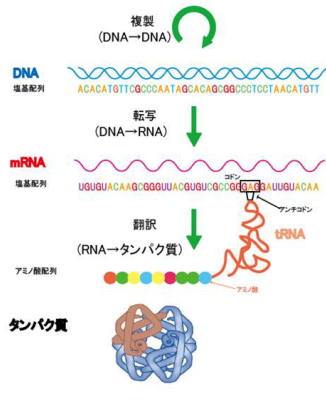
URL:

<http://hdl.handle.net/2433/201351>

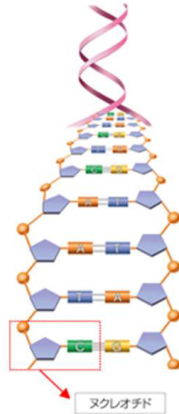
RIGHT:

細胞中で遺伝情報がタンパク質に翻訳される過程

1. セントラルドグマ



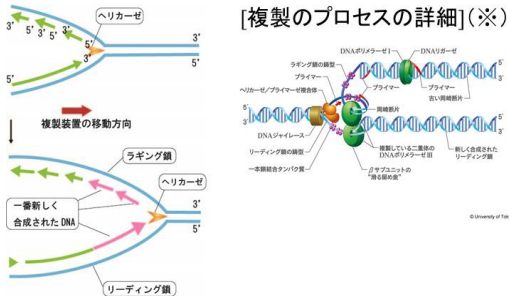
2. DNAの二重らせん構造 (※)



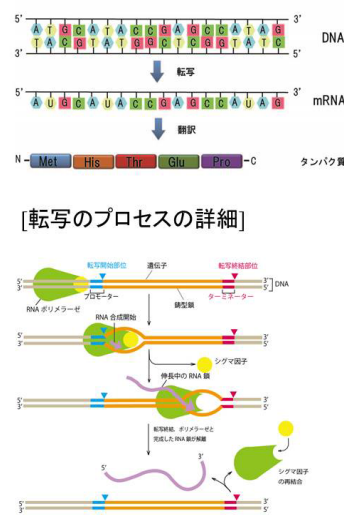
3. DNAとRNAを構成するヌクレオチドの相違

	五炭糖		塩基の種類
	名称	構造の特徴	
DNA	デオキシリボース		・アデニン(A) ・チミン(T) ・グアニン(G) ・シトシン(C)
RNA	リボース		・アデニン(A) ・ウラシル(U) ・グアニン(G) ・シトシン(C)

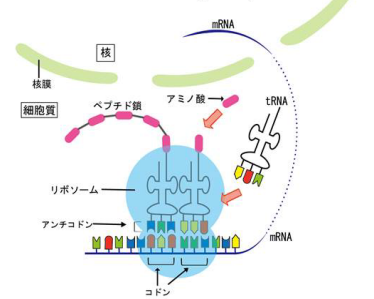
4. DNA→DNA (複製)



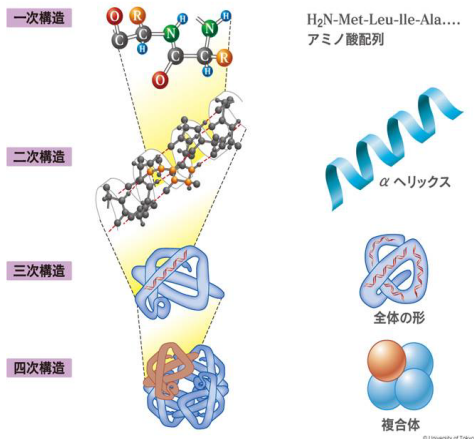
5. DNA→RNA (転写)



6. RNA→タンパク質 (翻訳)



8. タンパク質の構造 (※)



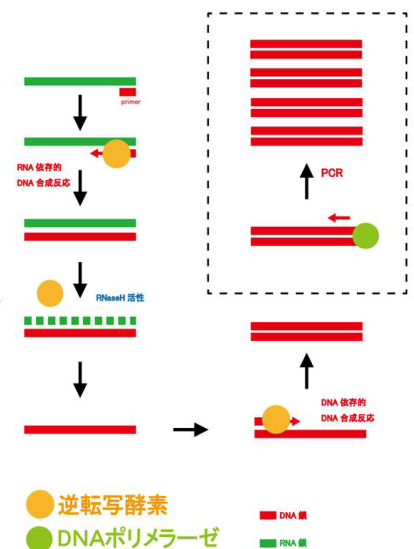
逆転写酵素に関する研究 —感度と正確性を上げる研究

酵素反応の感度と正確性

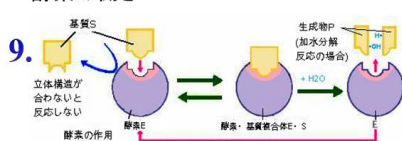
	エラー率
DNA→DNA (複製)	10億塩基に1回
RNA→DNA (逆転写)	1万塩基に1回

逆転写酵素の感度と正確性を上げることで、RNAからcDNAを合成することが容易になる

現在の遺伝子検査はDNAが主流だが、細胞中の核酸の7割以上はRNAである。RNAを対象とする新たな検査項目が開発され、実用化により食品製造業、畜産業、医療の更なる高度化に貢献できる。



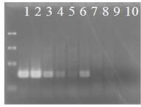
酵素の働き



9.

酵素の感度を上げる実験

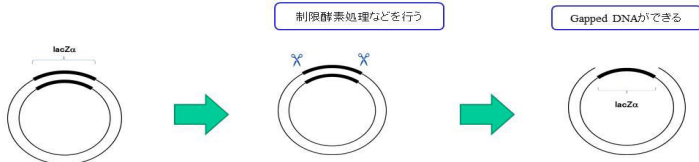
逆転写酵素の感度が上がると、より少ない分子数の標的RNAに対して酵素が活性を持つ。そのような条件を探るため、逆転写酵素の働きを助ける別の酵素や金属イオンの濃度条件、あるいはpHなど、様々な条件を変化させて検討した。
その結果、現在のところ標的RNA100分子を含む試料10 μLで逆転写反応を行った後の試料に対して行ったPCRでDNAの増幅が検出された。



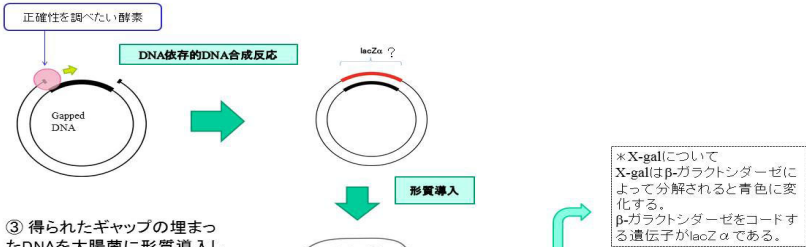
レーン
1,2: 1×10⁵ μL RNA
3,4: 1×10⁴ μL RNA
5,6: 1×10³ μL RNA
7,8: 1×10² μL RNA
9: 1×10⁵ μL RNA (酵素非存在)
10: RNAなし

酵素の正確性を調べる実験

① lacZ αを持つ二本鎖DNAのプラスミドをもとに、制限酵素処理などによってlacZ αをコードする領域が一本鎖となったDNA(gapped DNA)を作製する。

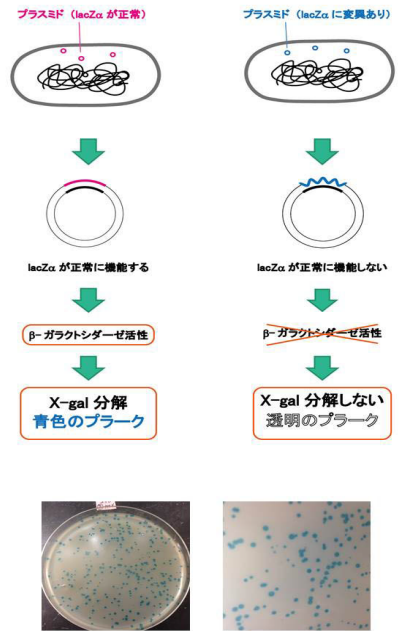


② Gapped DNAに正確性を調べたい酵素を反応させ、ギャップ部分の相補鎖を鋳型にDNA合成反応を行い、ギャップ部分を埋める。(DNA依存的DNA合成反応)



③ 得られたギャップの埋まったDNAを大腸菌に形質導入し、X-galとIPTGを含むプレート培地にまく。

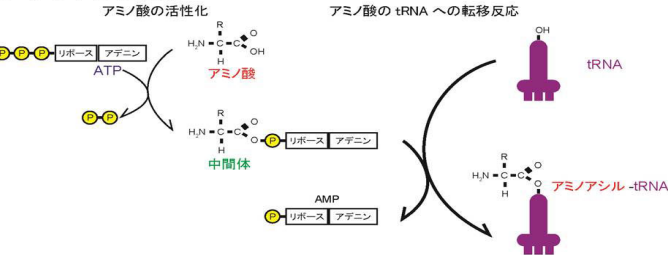
④. プラークの検討



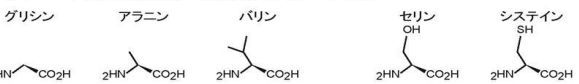
アミノアシル-tRNA合成酵素 (aaRS) に関する研究
—正確性を調べる研究

aaRS は、アミノ酸を tRNA に結合させる反応を触媒する。細胞内には、タンパク質を構成する 20 種のアミノ酸のそれぞれに対応する aaRS が存在する。各 aaRS は、進化の過程で、対応するアミノ酸と tRNA 認識する能力を高めてきた。ゆえに、その基質認識機構を明らかにすることは、酵素をデザインする上で有用な情報を与えると考えられる。

アミノアシル化反応



タンパク質を構成する類似したアミノ酸



反応スキーム

